# Analyse transcriptionnelle en cellules uniques des populations plasmocytaires résiduelles dans le Myélome Multiple

*Céline Mazzotti, Antoine Graffeuil, Laure Buisson, Jill Corre, Hervé Avet-Loiseau*
*(Equipe 13 du CRCT)*

# Le Myélome Multiple

- 2ème hémopathie maligne la plus répandue
- 5000 nouveaux cas par an en France
- Accumulation anormale des plasmocytes de la moelle osseuse
- Lésions osseuses, douleurs
- Actuellement incurable, médiane de survie <10 ans

# La maladie résiduelle

- Cliniquement indétectable
- Moléculairement quantifiable (∅ mononucléées puis NGS par amplicons)
- Cellules résiduelles = émergence de « clones » résistants au(x) traitement(s) OU contournement par adaptation ?

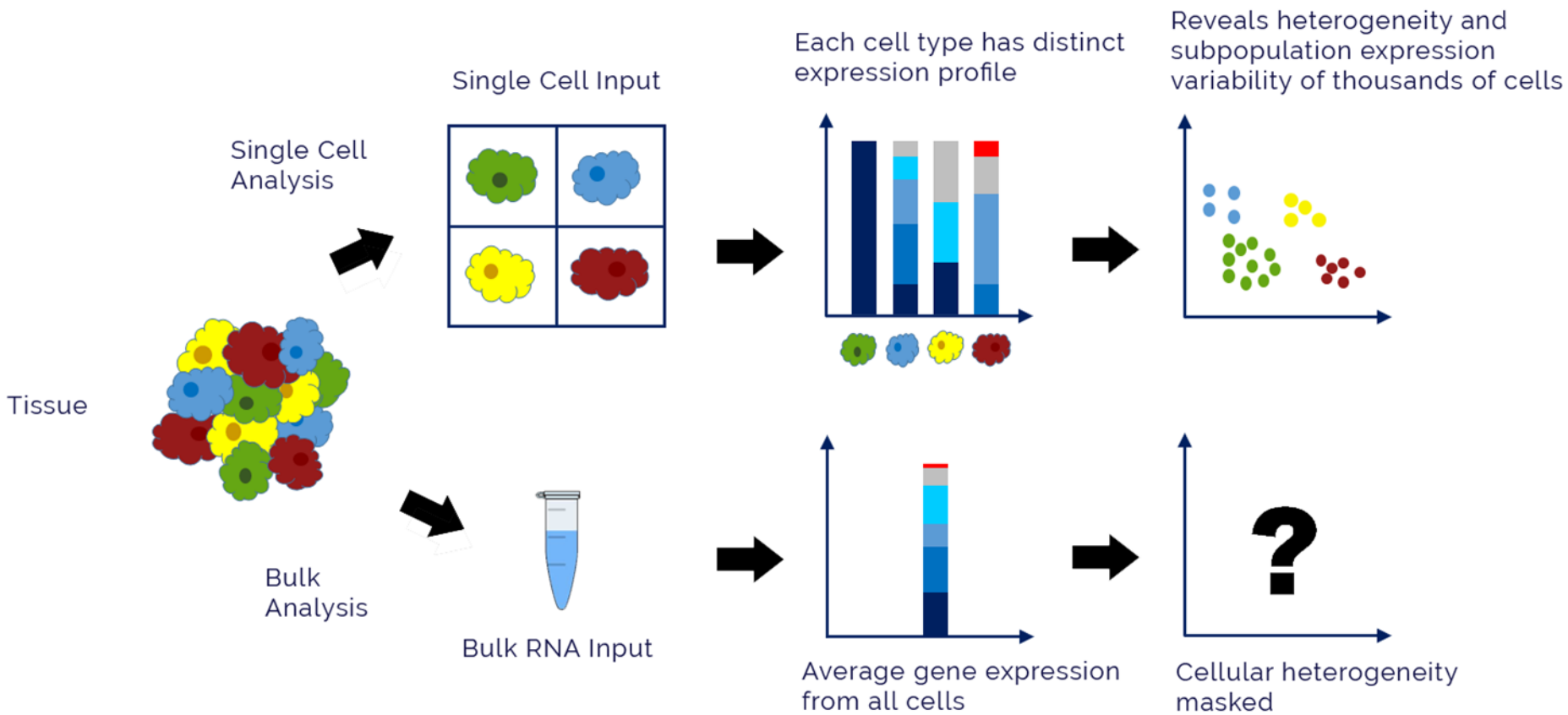
# Pourquoi transcriptomique ?

- Essais Fluidigm MRD en Whole Genome non concluants
  <100Ȼ = représentation hétérogénéité moyenne
- Profils mutationnels en cours de développement pour MM
- Implication des voies de signalisation

# Pourquoi en cellules uniques ?

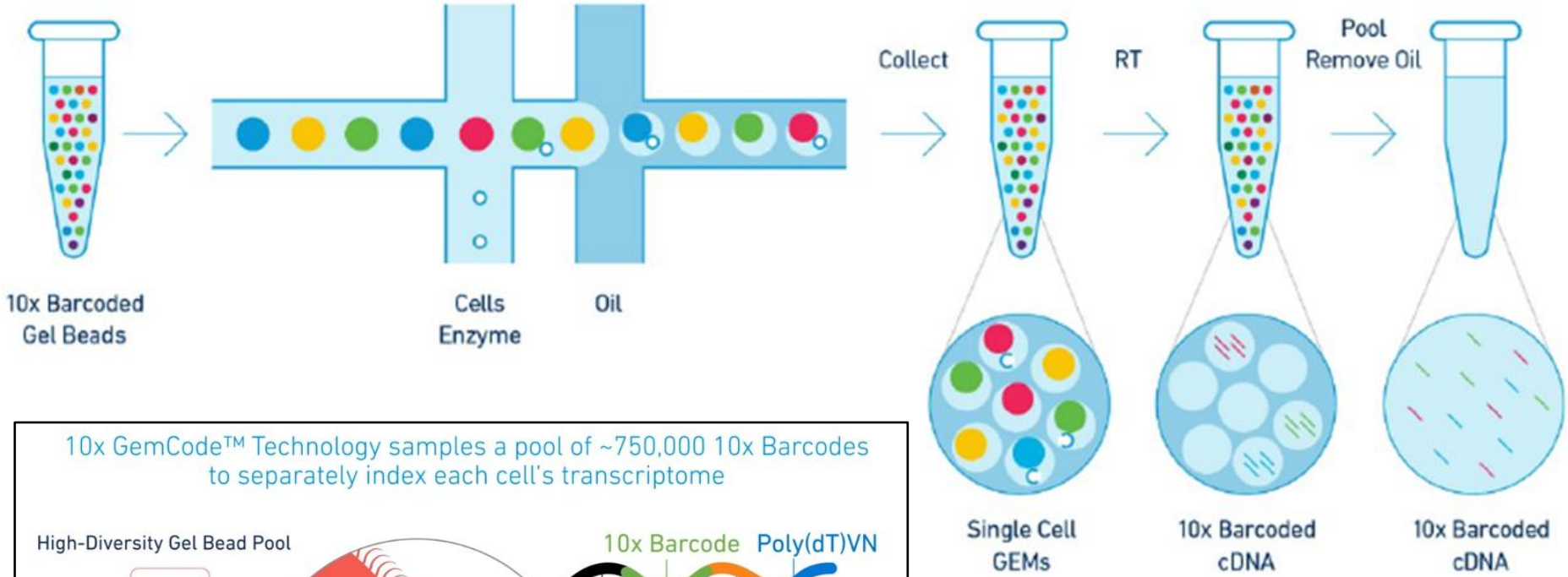
- Présence de plasmocytes normaux dans moelle osseuse
- Hétérogénéité intratumorale ++ dans MM
- Transcriptomique « globale » = image tronquée
  - Sous-clones cellulaires minoritaires non représentés
  - Aucune notion des proportions entre populations

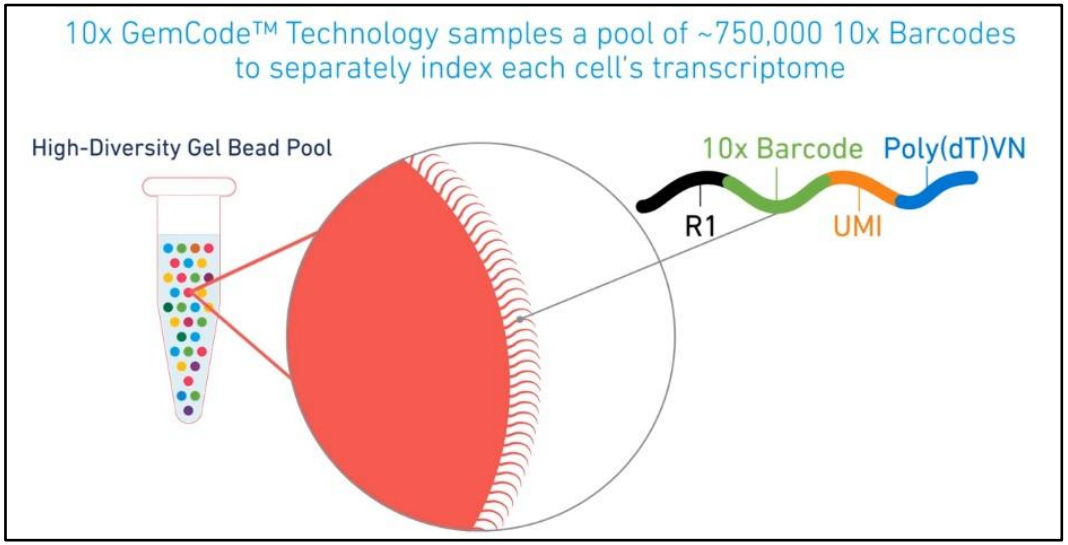
# Intérêt Single Cell VS Bulk




Source: LC sciences™

# Principe émulsion Chromium 10X

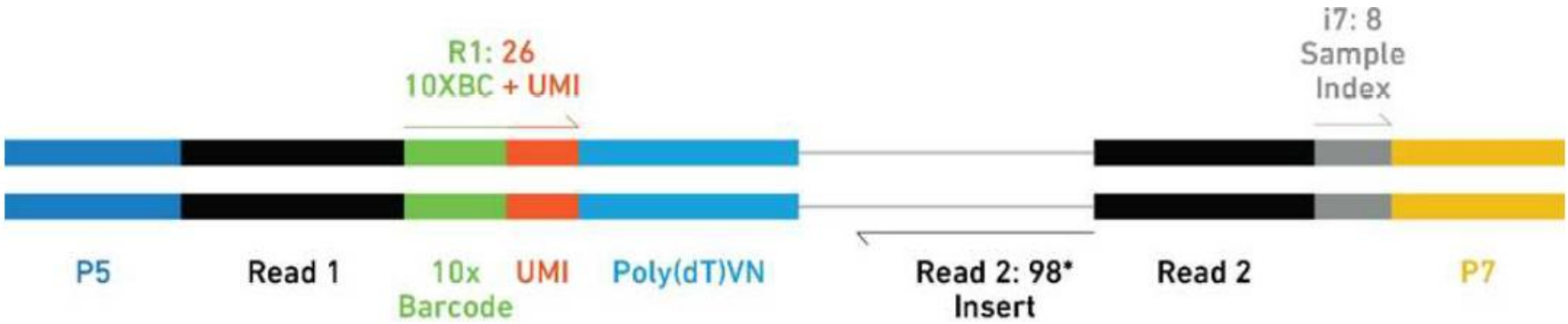



Source: 10X Genomics™

# Chromium 10X

## Type de librairie obtenue :




Id. ∁ / Id. ARNm

Id. patient

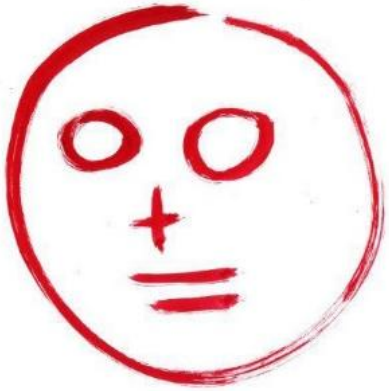
# Stratégie

- Patients traités de façon homogène par :
  - Inhibiteur de protéasome (Velcade)
  - Immunomodulateur (Lenalidomide ou Thalidomide…)

- Analyse au diagnostic et après 3 cycles de traitement
  - Marquage spécifique et lyse GR sur moelle totale
  - Sélection des plasmocytes par cytométrie en flux (CD38+, CD138+ et marqueur de viabilité)
  - Immunophénotypage des plasmocytes
  - Répartition unicellulaire par Chromium (10X) et RT
  - Préparation de librairies pour NGS, séquençage
  - Analyses bioinformatiques → profils transcriptionnels

# Délais

- Prélèvements Diag/MRD = 3 mois ou +
- Injection ₵ --> fin de préparation de librairie = 2 semaines max
- Fin prépa lib. --> séquençage = 2 semaines
- Séquençage --> démultiplexage et contrôle qualité = 2 semaines
- Analyses biostatistiques = 2 semaines



8 semaines entre injection ₵ et résultats
6 semaines entre injection ₵ et estimation « rendement » de manip

# Points fondamentaux

- Logistique :

- Homogénéité des techniques diag/réponse
- Coupler patients au diag et réponse MRD
- Délai ponction-injection Ȼ (disponibilité des appareils)
- Optimisation température de travail, concentration cellulaire, viabilité, nombre de Ȼ

- Bioinformatique :

- Connaître le profil type d'un plasmocyte « normal »

→ Analyses de moelles saines (0,25% de plasmocytes)

- Intérêt pour clusters excentrés, élimination du BF

# Conservation des ₵ par fixation

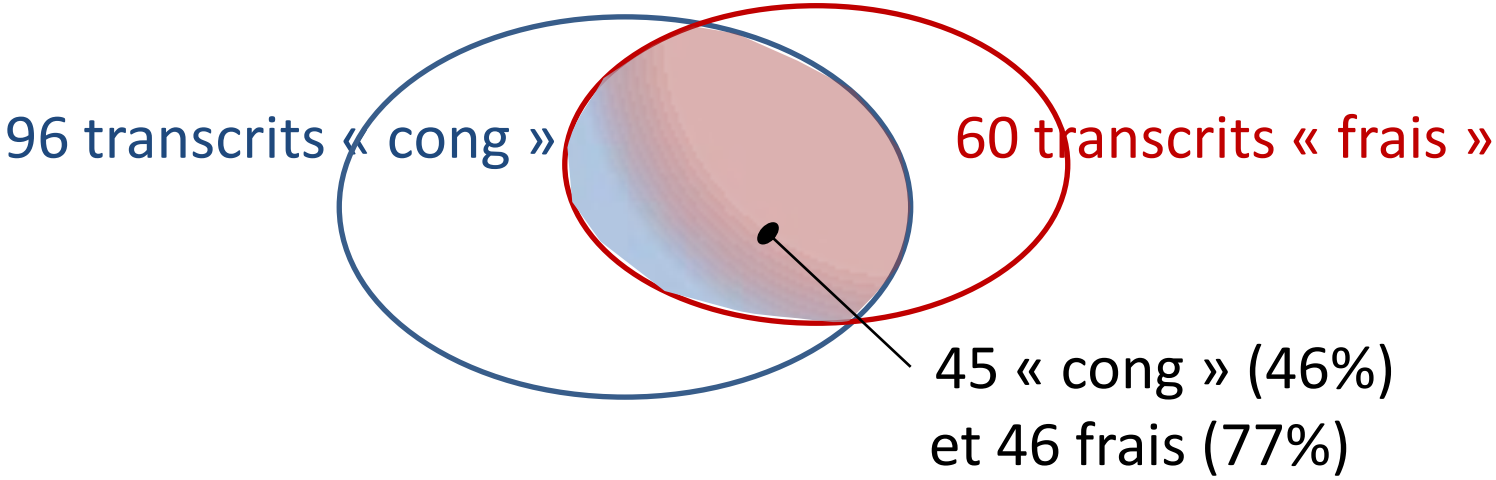
| Avant proto fixation | | Ampoule | | | Réhydratat° | | Perte |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Nb ₵ fixées | Viabilité | Nb ₵ finales | Viabilité | Perte | Nb ₵ | Perte | totale |
| 185k | 88% | 34k | 0% | 82% | 0 | 100% | 100% |
| 1,23M | 84% | 530k | 0% | 57% | 18k | 97% | 99% |
| 1M | 70% | _ | _ | _ | 68k | _ | 93% |
| 200k | 70% | _ | _ | _ | 4,7k | _ | 98% |
| 200k | 70% | _ | _ | _ | 0,35k | _ | 100% |

# Cryoconservation

| Avant proto | | Ampoule | | | Décongélation | | | Perte |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Nb ₵ | Viabilité | Nb ₵ finales | Viabilité | Perte | Nb ₵ | Viabilité | Perte | totale |
| 10,1M | 74% | 5,85M | 71% | 42% | _ | _ | _ | _ |
| 700k | 87% | 350k | _ | 50% | _ | _ | _ | _ |
| 888k | 89% | 350k | _ | 61% | 80k | 92% | 77% | 91% |
| 12M | 86% | 11,9M | _ | 1% | _ | _ | _ | _ |
| 750k | _ | 107k | 89% | 86% | _ | _ | _ | _ |

*NB : Méthode d'enrichissement CD138+, pas FACs !*

# Comparaison congélation/cellules fraîches




- Top 50 transcrits différentiellement exprimés :
  - Congelées : 4 gènes communs à 2 concentrations ≠
  - Fraîches : 37 gènes communs à 2 concentrations ≠

CCL : Analyse transcriptionnelle réduite sur plasmo congelés

Tests réplicats :

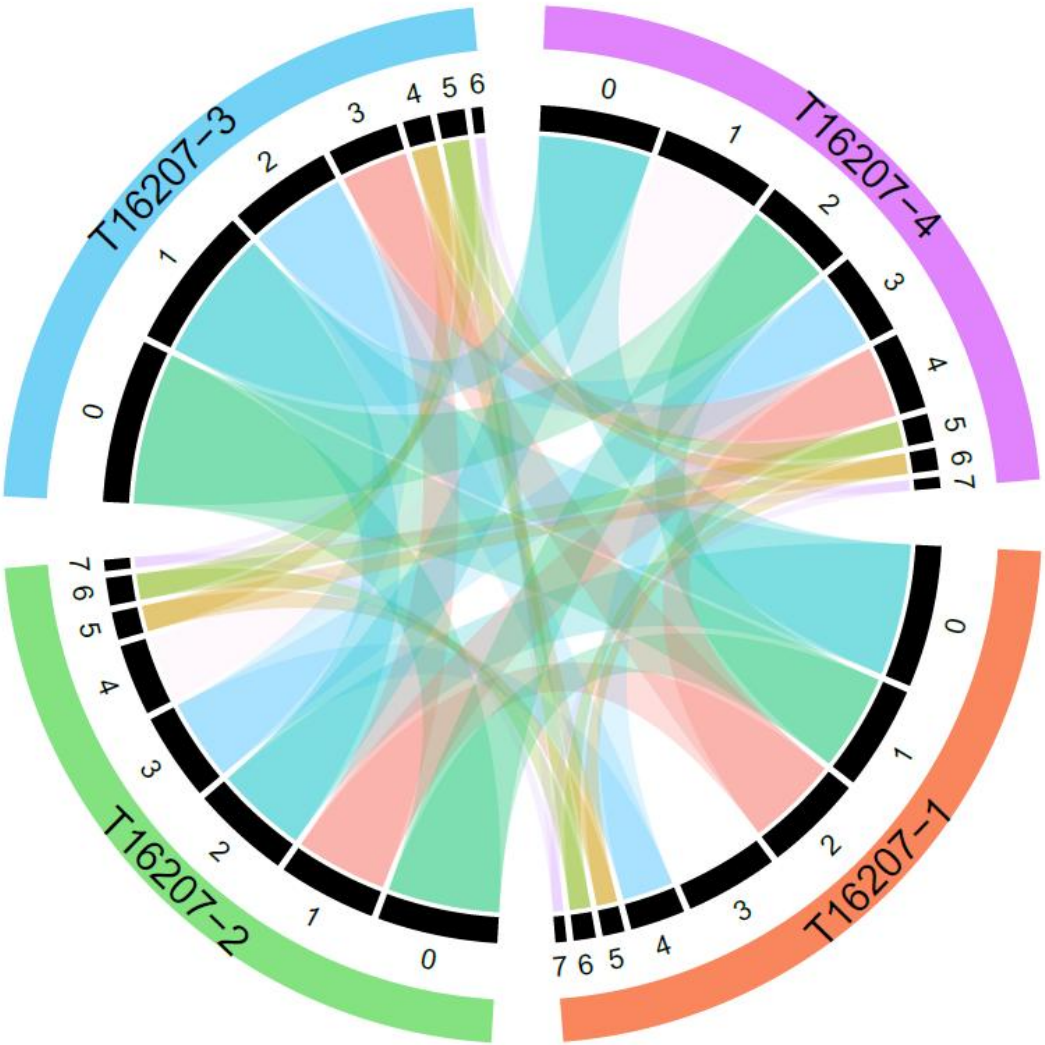
T16207
Même manip, 4x3000₵ injectées à 3550₵/µL. Viabilité 98%

| | nb ₵ séquencées | % capture ₵ vivantes | Nb reads/₵ | Nb gènes/₵ |
|---|---|---|---|---|
| **T16207-1** | 1404 | 48 | 89094 | 1901 |
| **T16207-2** | 1319 | 45 | 89253 | 1936 |
| **T16207-3** | 1276 | 43 | 89874 | 1982 |
| **T16207-4** | 1268 | 43 | 93746 | 1945 |

*NB : Méthode d'enrichissement CD138+, pas FACs !*

## Tests réplicats :

Chaque population retrouvée
→ Technique robuste



## Tests risque de « doublets » :

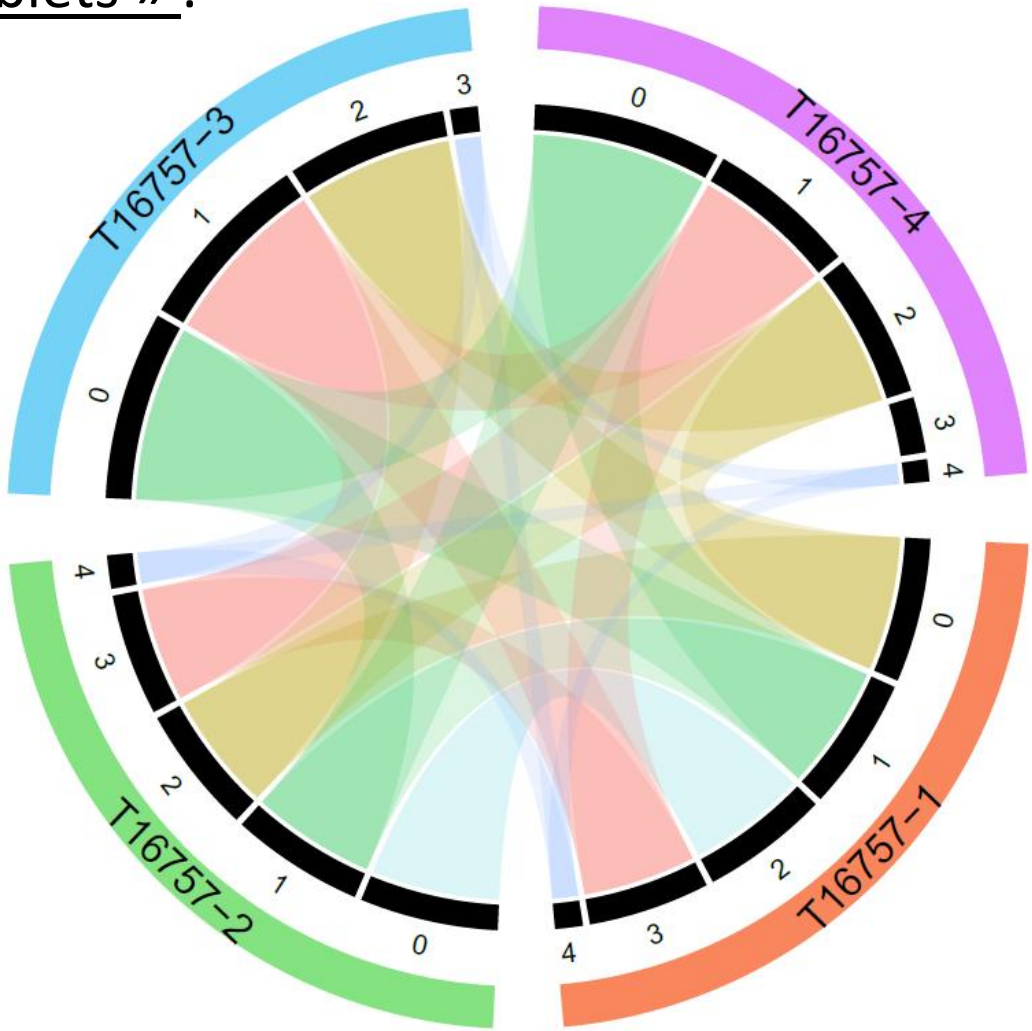
T16757
Même manip, 1x9000₵ et 3x3000₵ injectées, 1350₵/µL.
Viabilité 65%

| | nb ₵ séquencées | % capture ₵ vivantes | Nb reads/₵ | Nb gènes/₵ |
|---|---|---|---|---|
| **T16757-1** | 1302 | 22 | 89774 | 1726 |
| **T16757-2** | 562 | 29 | 210182 | 1997 |
| **T16757-3** | 739 | 38 | 162126 | 2134 |
| **T16757-4** | 695 | 36 | 169123 | 2159 |

*NB : Méthode d'enrichissement CD138+, pas FACs !*

## Tests risque de « doublets » :

Une population de plus pour 9000Ȼ et le 1er réplicat des 3000Ȼ injectées




CCL : Plus de cellules ⇏ plus d'info MAIS ↗ risque doublets (info erronée)

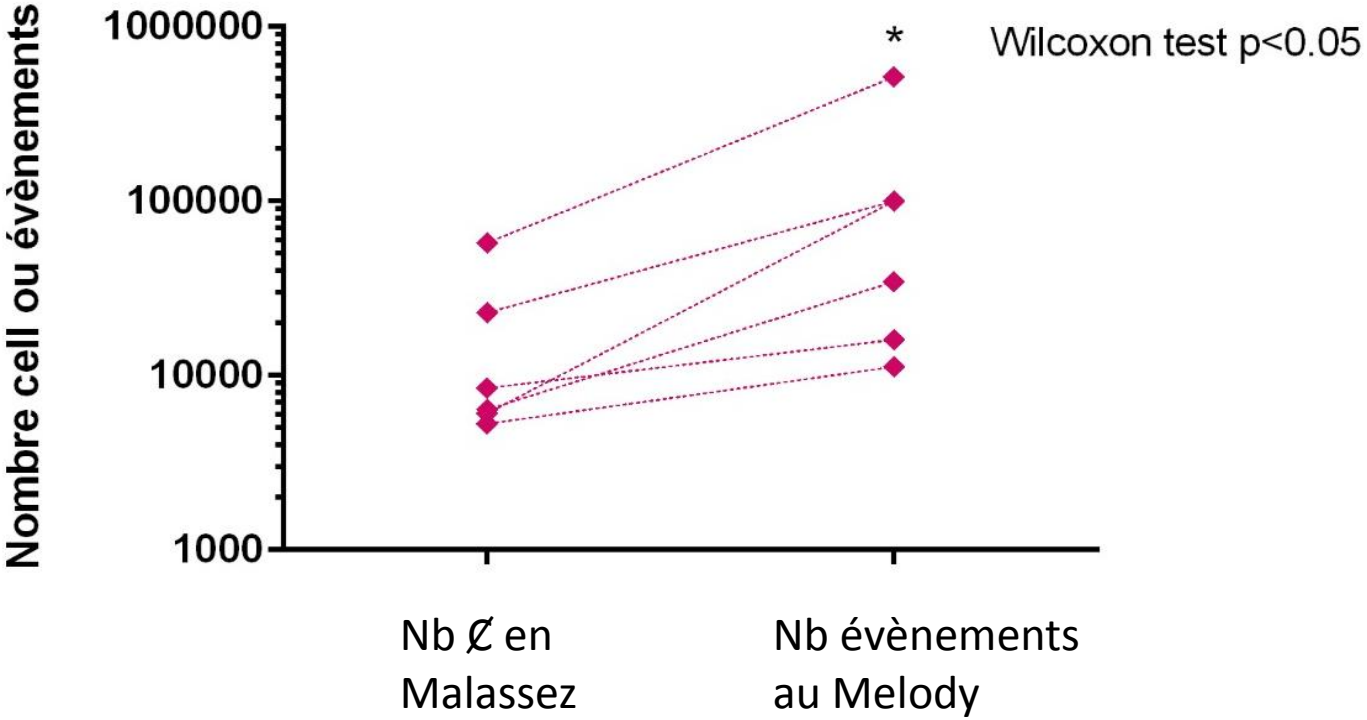
Viabilité (seuil = 85% théorique) :

| Comment ? | Pourquoi ? |
| --- | --- |
| - Homogénéisations, pipetages et centri doux<br>- Réduction « attente »<br>- Marqueur en CMF<br>- Vérification par trypan | - ARNm flottants capturés → bruit de fond<br>- ¢ en souffrance → qualité ARN ↘<br>→ gènes de stress ↗ |

Taux de capture et analyse transcriptomique impactés

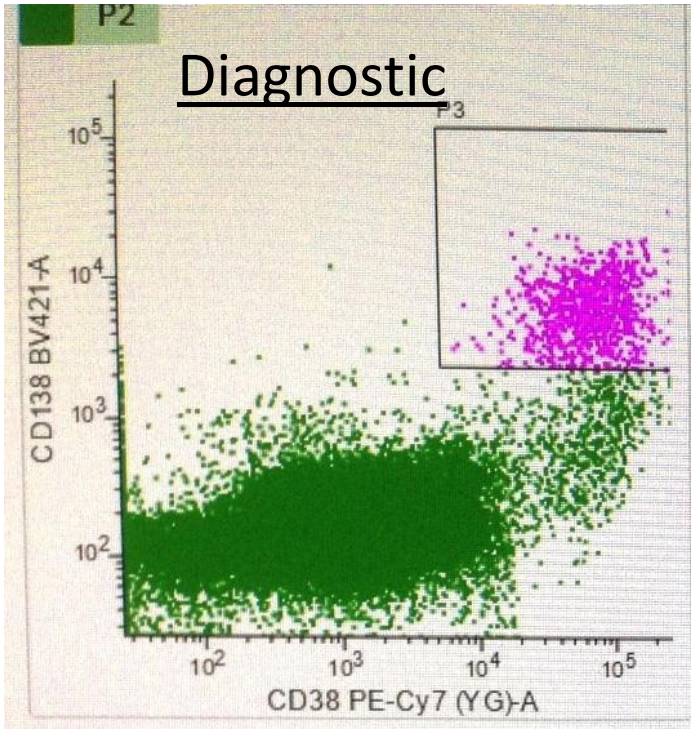
## 1. Nombre de cellules et phénotype

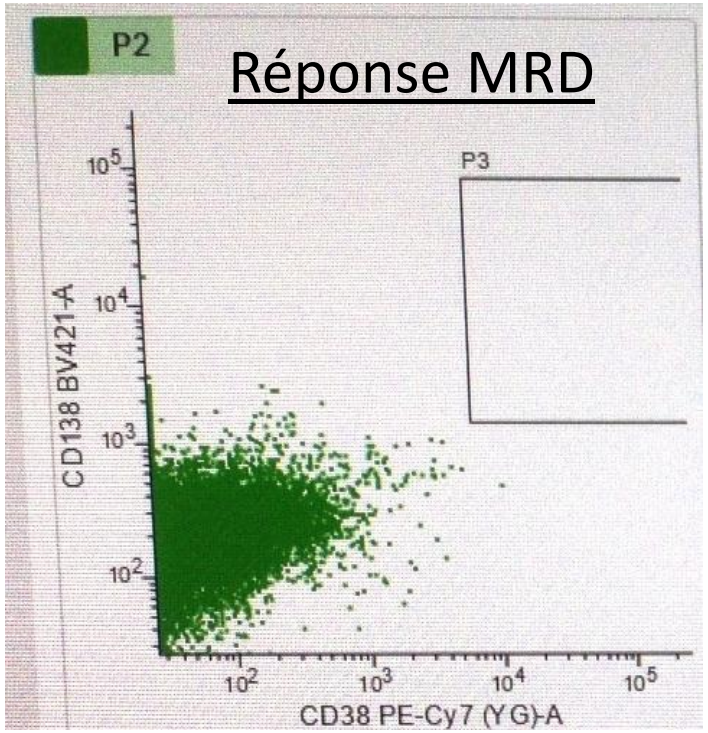
⚠ Nombre d'« évènements » rendus par la CMF non fiable
Compte Luna impossible (trop dilué) → Malassez + trypan



## 1. Nombre de cellules et phénotype

- Tri par CMF :
  0,1-8% de plasmocytes viables au diag VS 0-0,1% en MRD



## 1. Nombre de cellules et phénotype

- Profils immunophénotypiques ≠ entre diag et MRD : lié au pourcentage tumoral ?

--> Analyses des fichiers FACs à venir

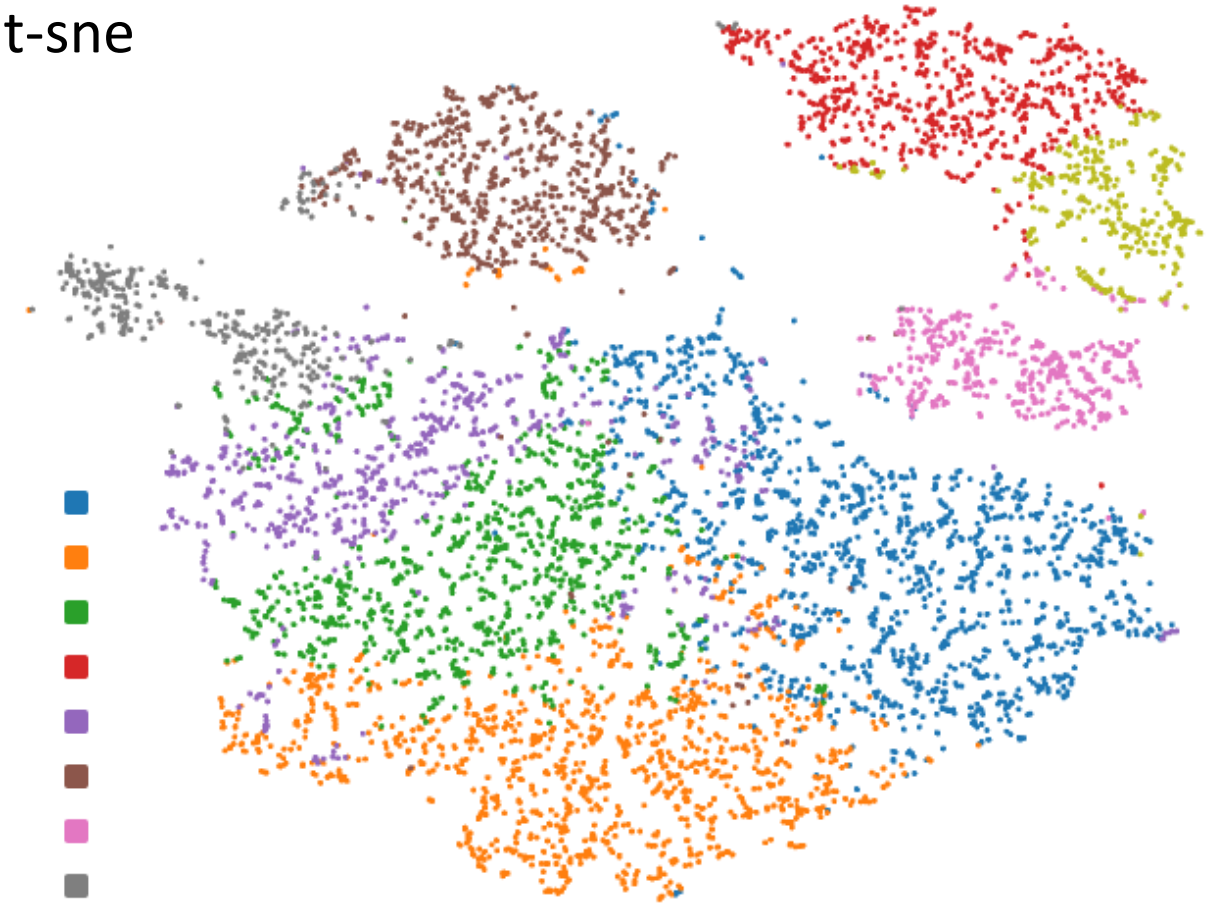
## 2. « Rendement » de manip et séquençage, **V2**

| | **DIAG** | **MRD** |
|---|---|---|
| **Nombre plasmo injectés** | 4471 (n=10) | 5746 (n=4) |
| **Taux capture ¢ viables** | 40% (n=24) | 25% (n=1) |
| **Nombre de gènes/¢** | 1165 | 1449 |

# 3. Analyses bioinformatiques

## - Représentation t-sne

Ex : T17061-Agg
(SMM haut risque)
Enrichissement CD138 ;
viabilité 92% ; 2x6500₵ ;
capture 51%



- Cluster 1 (1416)
- Cluster 2 (1202)
- Cluster 3 (956)
- Cluster 4 (688)
- Cluster 5 (650)
- Cluster 6 (629)
- Cluster 7 (436)
- Cluster 8 (357)
- Cluster 9 (316)

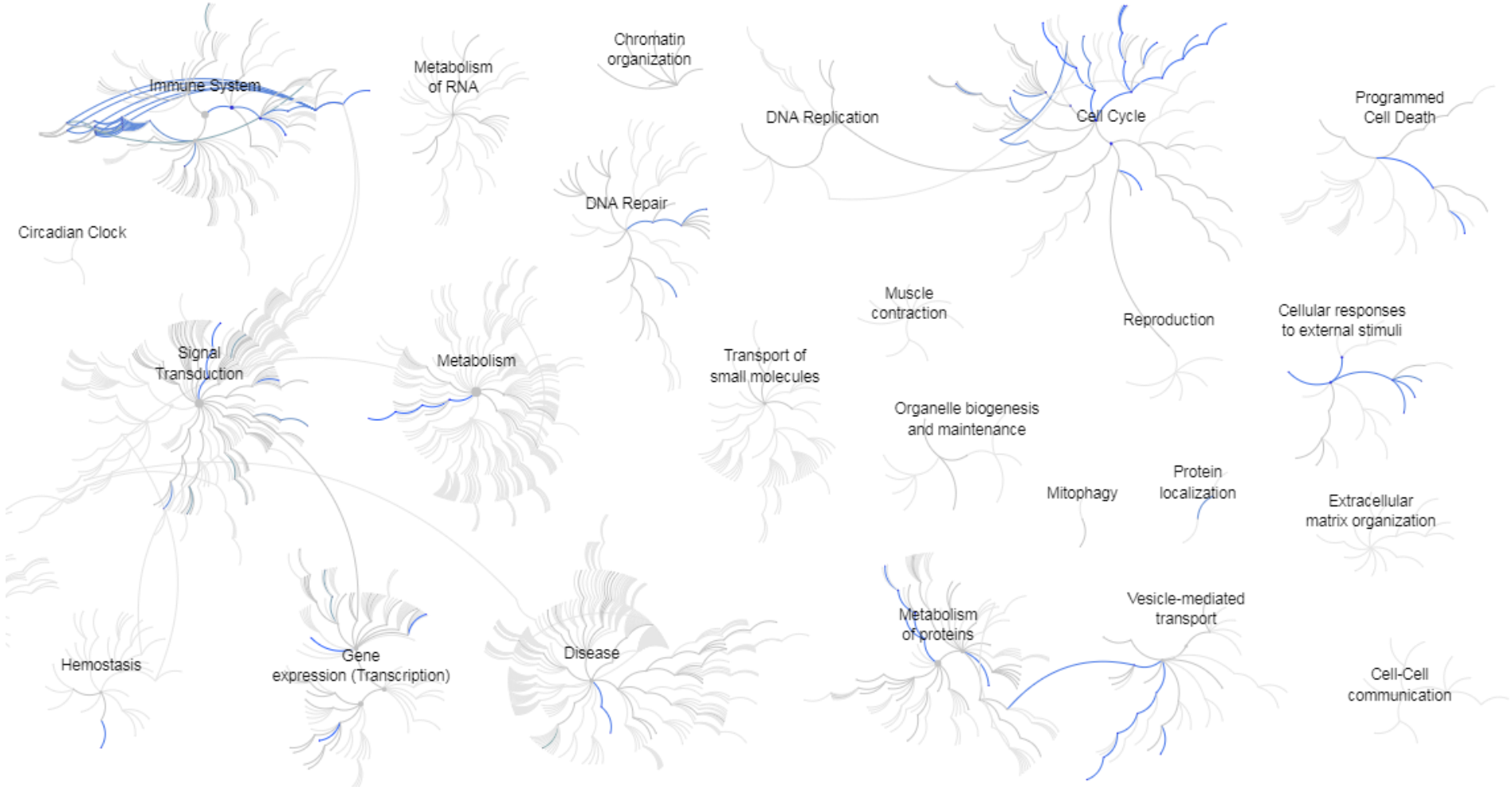
MM et MRD → Single Cell → Stratégie → Optimisation → 1ers résultats

# 3. Analyses bioinformatiques

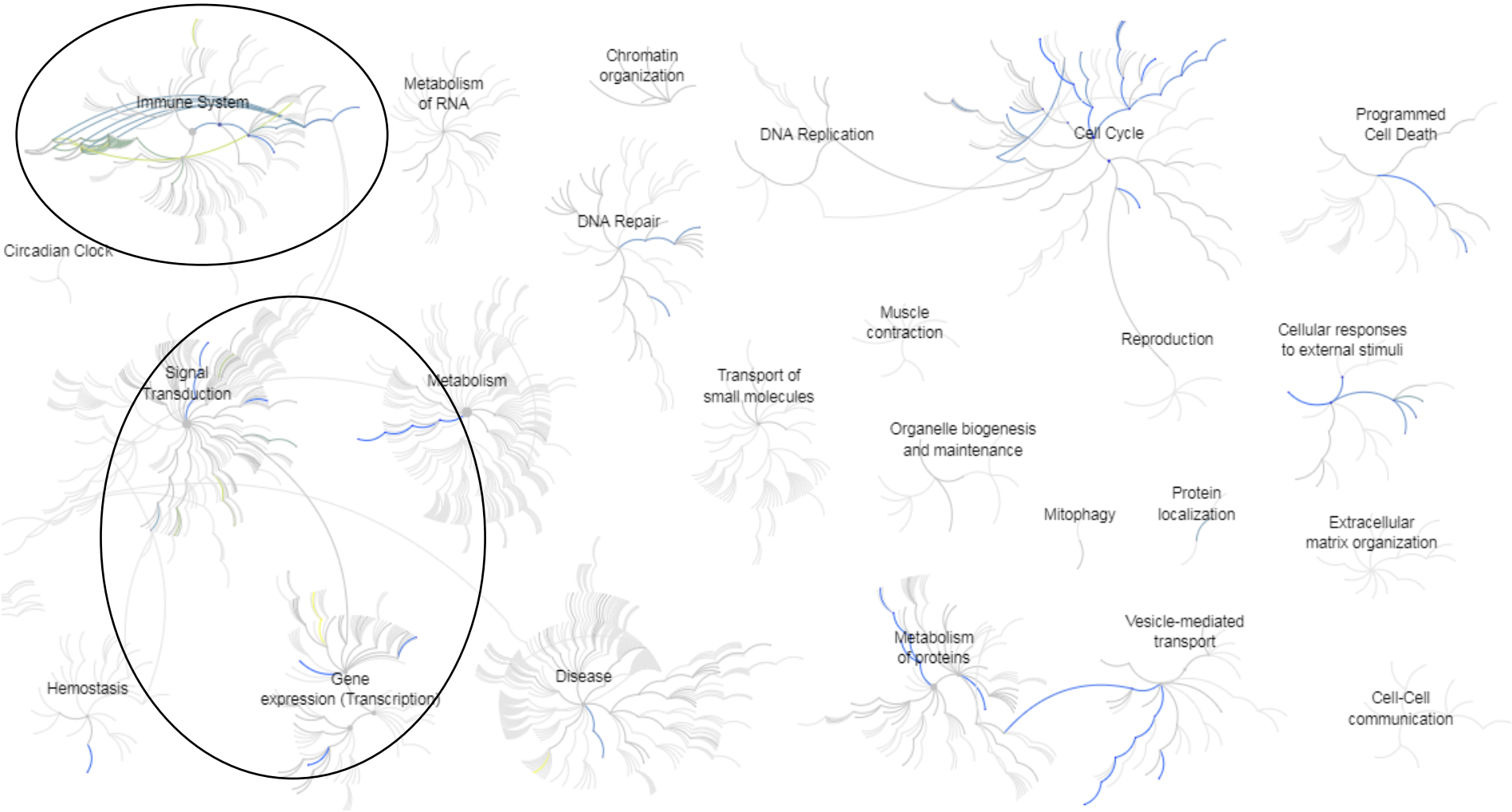
- Top 50 des gènes différentiellement exprimés

| Gene Name | Cluster 1 | Cluster 2 | Cluster 3 | Cluster 4 | Cluster 5 | Cluster 6 | Cluster 7 | Cluster 8 | Cluster 9 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| [illegible] | [illegible] | [illegible] | [illegible] | [illegible] | [illegible] | [illegible] | [illegible] | [illegible] | [illegible] |
| TK1 | Down | D | D | | D | D | | Up | |
| TYMS | Down | D | D | | | | | Up | |
| TUBA1B | Down | D | | | | | | Up | |
| STMN1 | Down | D | | | | | | Up | |
| HIST1H4C | Down | D | D | | | D | | Up | |
| TUBB | Down | | | | | | | Up | |
| LMNA | Down | | | D | | | | | |
| PHF19 | Down | D | D | | D | | | Up | |
| FOS | Up | | D | D | Up | | | | |
| CKS1B | Down | D | | | | | | Up | |
| RNASEH2A | Down | D | | | | | | Up | |
| PTTG1 | | D | | | | | | Up | |
| TMEM106C | | D | | | | | | Up | |
| FOSB | | | D | D | Up | | | | |
| DUSP1 | | | D | D | Up | | | | |
| GADD45A | | | | D | | | | | |
| GADD45B | | | | D | | D | | | |
| JUN | | | | D | Up | | Rien de significatif | | Rien de significatif |
| ZFP36 | | | | D | | | | | |
| NFKBIA | | | | D | | | | | |
| ID2 | | | | D | | D | | | |
| PIM1 | | | | D | | | | | |
| TRIB1 | | | | D | | | | | |
| ID1 | | | | D | | | | | |
| NEAT1 | | | | D | | | | | |
| KLF4 | | | | D | | | | | |
| PPP1R15A | | | | D | | | | | |
| MCL1 | | | | D | | | | | |
| JUND | | | | D | | | | | |
| ANKRD28 | | | | D | | | | | |
| IER2 | | | | D | | | | | |
| CITED2 | | | | | Up | | | | |
| CCL3 | | | | | Up | D | | | |
| HMGB2 | | | | | | | | Up | |
| RPL39L | | | | | | | | Up | |
| NUDT1 | | | | | | | | Up | |
| ZDHHC12 | | | | | | | | Up | |
| RANBP1 | | | | | | | | Up | |

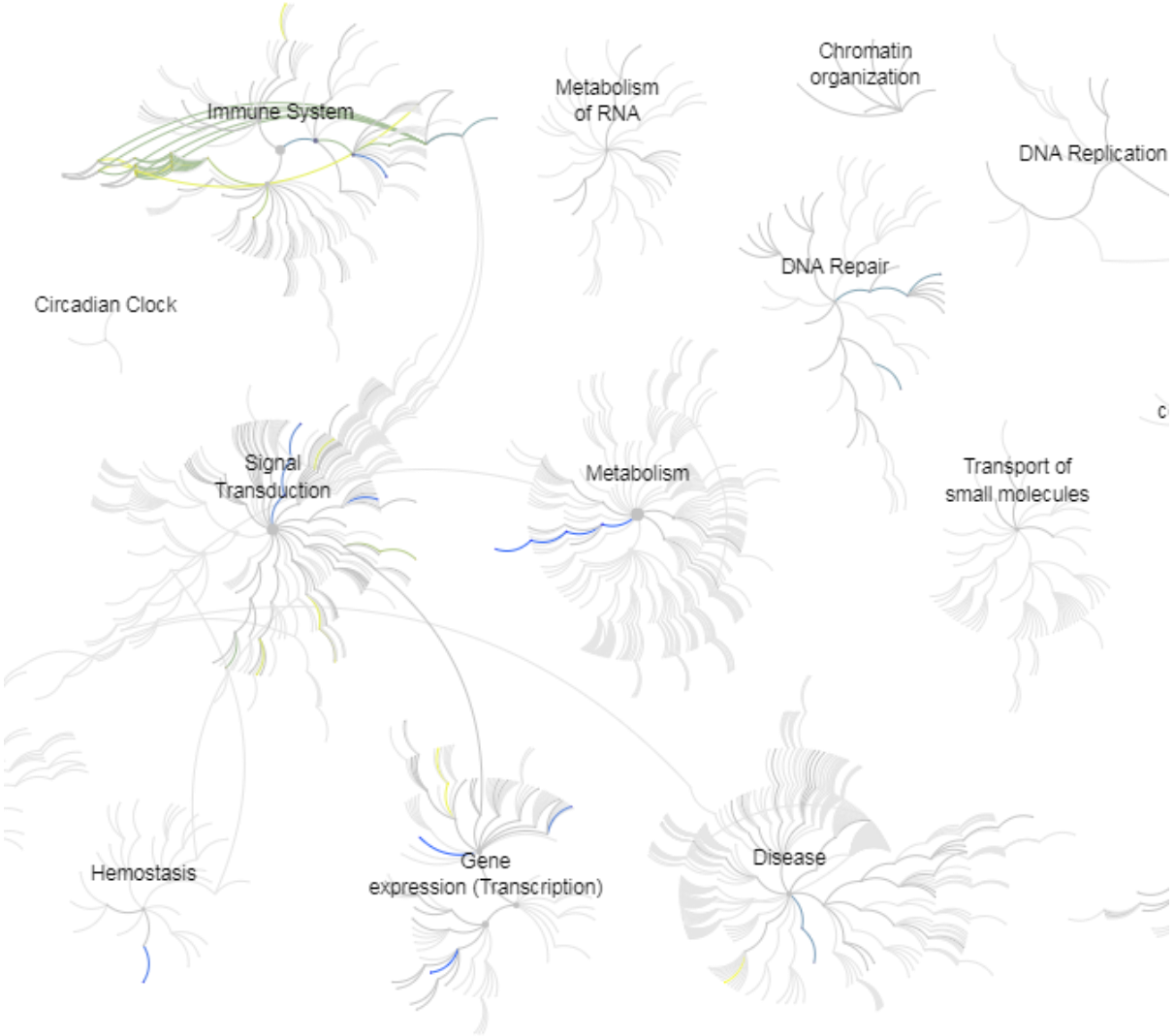
# - Voies de signalisations : T17061-Agg, cluster 4 excentré



- Voies de signalisations : T17061-Agg, cluster 8 « up »



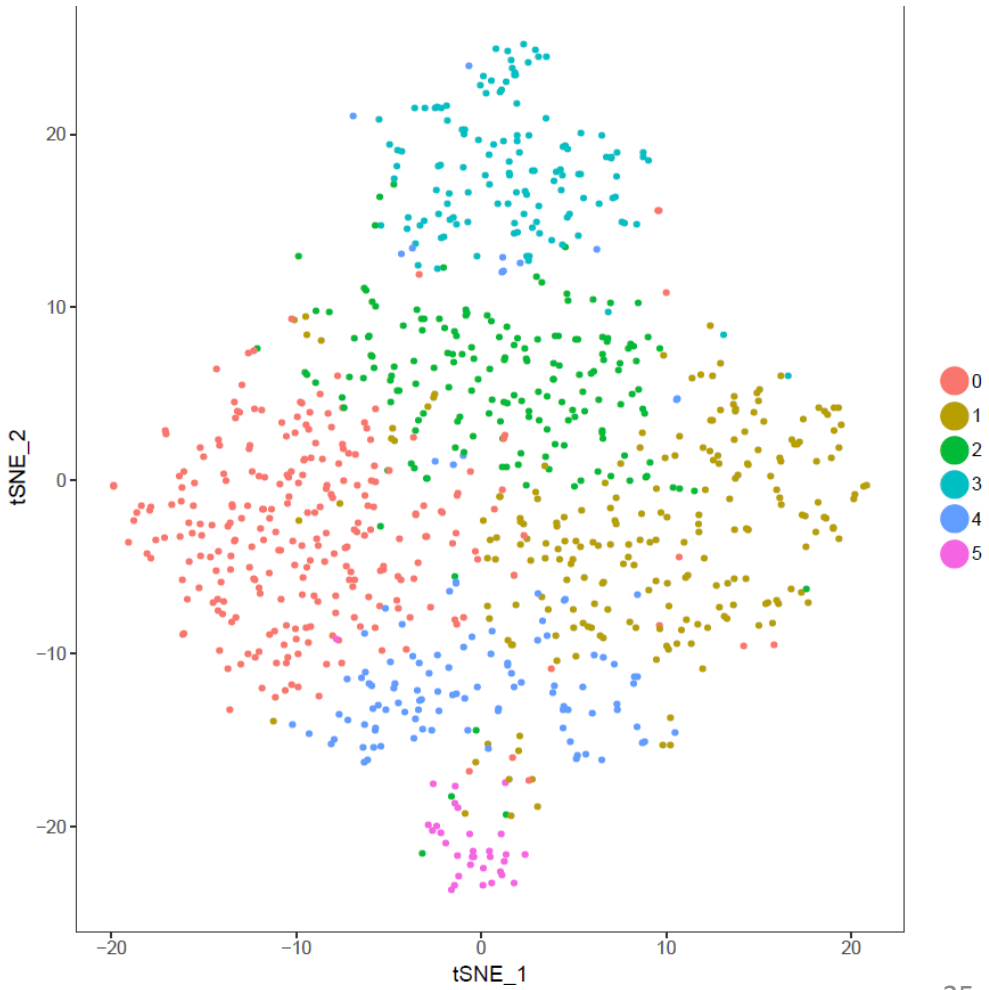
- Voies de signalisations : T17061-Agg, cluster 5 singulier



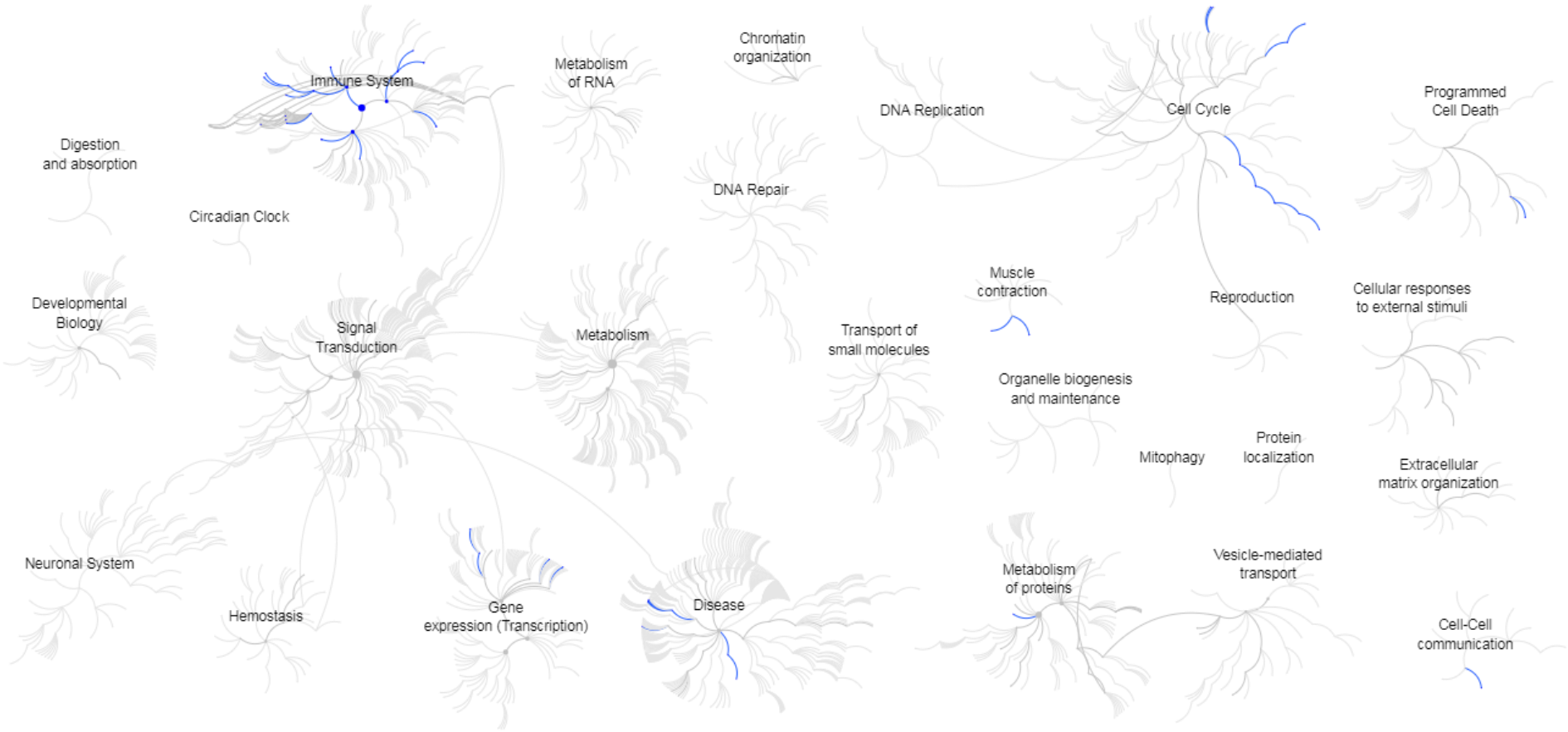
# 3. Analyses bioinformatiques

- Représentation t-sne

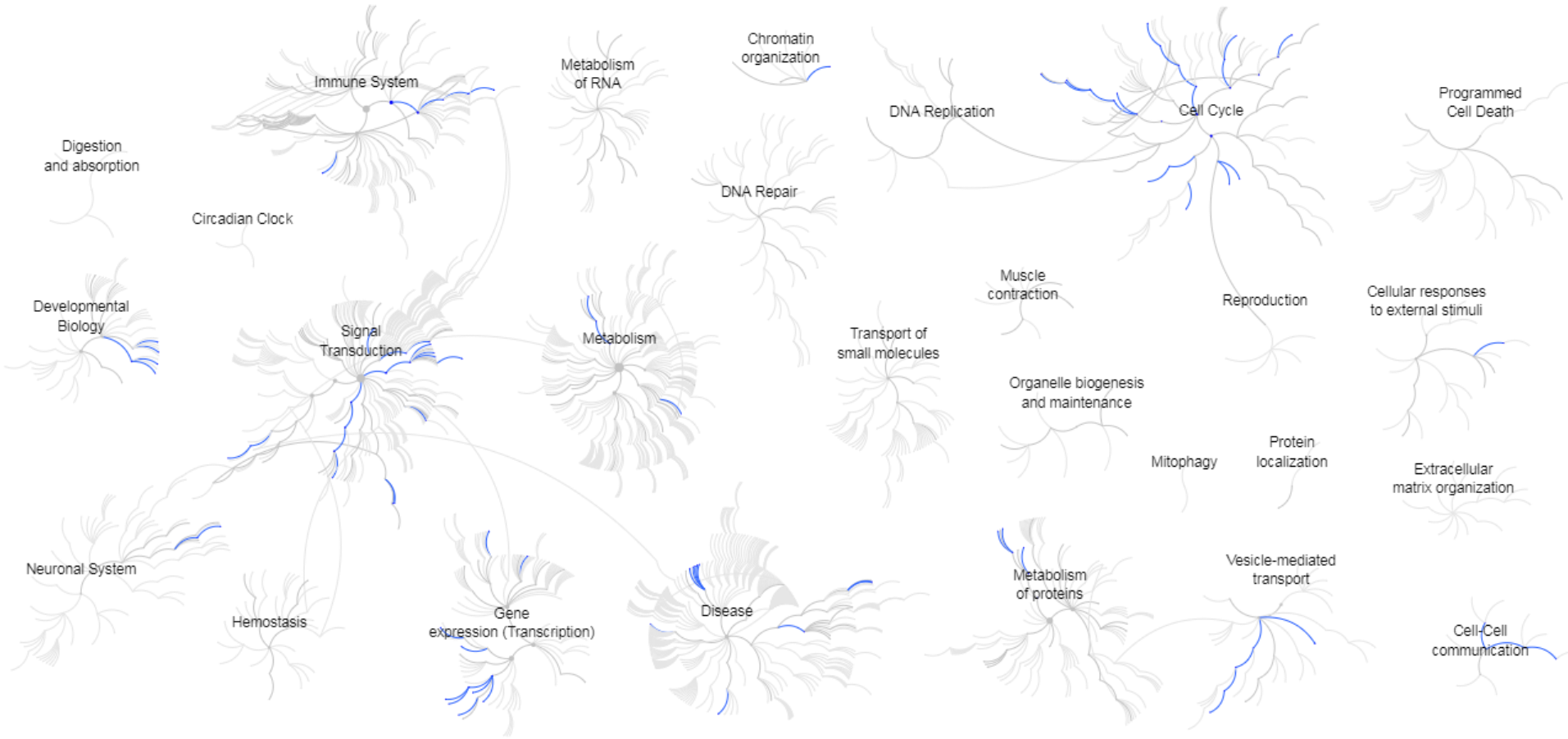
Ex : T17769 (Diag)
FACs CD138+, 38+ et viables ;
7915 « events » ;
capture 19%



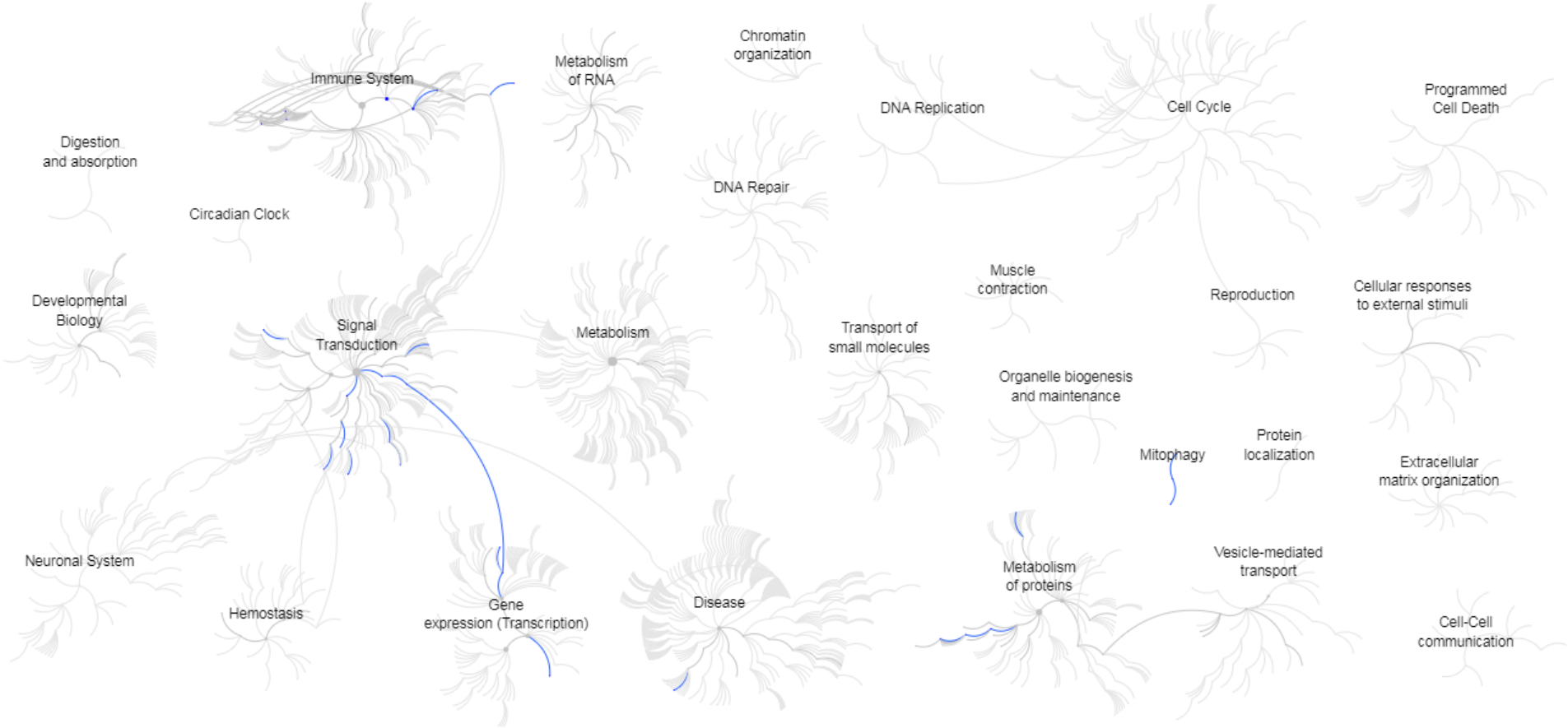
- Voies de signalisations : T17769, cluster 3 excentré



- Voies de signalisations : T17769, cluster 5 excentré



- Voies de signalisations : T17769, clusters 0-1 centraux



# Perspectives

- Voies de signalisation choisies par le TTT (VRD ou VTD) = homogénéité entre les patients ?

- Connaissance du transcriptome des clones résistants → orientation TTT avec autres molécules ?

- Profil transcriptionnel « normal » détecté en pré-greffe → rémission ?

- Analyse avec 10 patients appariés (diag + réponse)

# Perspectives

- Et aussi…

1. Relier transcriptomique diag et MRD à un phénotypage tumoral spécifique (?) des plasmocytes

2. Coupler transcriptomique diag à :
   - profil mutationnel
   - CNV (info pour stratification haut et bas risque)
   - accessibilité chromatine (épigénétique hors méthylations)
   - transcriptomique du microenvironnement

# Remerciements

Les techniciens de l'équipe UGM (CHU)
Cliniciens de Lille, Poitiers, Dijon, Toulouse et Bordeaux
Laure Buisson, Marie-Laure Nicolau-Travers, François Vergez
Alice Cleynen (U. Montpellier)

CRCT : Manon Farcé
Carine Valle
Nadège Carrié
Assia Asrir, Léa Lemaître, Marianne Weulersse
Laura Do Souto

GeT : Delphine Labourdette
Frédéric Martins

# Aide-mémoire

**-CD138 ou Syndecan-1** : participates in cell proliferation, cell migration and cell-matrix interactions via its receptor for extracellular matrix proteins. Syndecan-1 is a sponge for growth factors. Specific antigen on multiple myeloma cells

**-CD38** : exprimé à la surface des cellules immunitaires, sa stimulation participe à la prolifération des cellules myéloïdes

**-CD56 ou NCAM1 (Neural Cell Adhesion Molecule**) : glycoprotéine impliquée dans l'adhésion des cellules entre elles. Exprimé par NK, ++ chez 75% des plasmo tumoraux

**-CD117 ou KIT** : important marqueur d'identification des CSH, des cellules souches multipotentes, et des précurseurs de la lignée myéloïde. Récepteur de facteur de croissance des stem cells. Proto-oncogène c-kit→ croissance cellulaire

**-CD81 ou TAPA1** : expressed in hemopoietic cells, absent in neutrophils. Complex with integrins and induces signal to regulate cell development, activation, motility and growth.
Gène localisé dans une région de gène suppresseur de tumeur

# Aide-mémoire

**-CD19** : CD19 se trouve associé au CD21 et CD81, tous trois appartenant au corécepteur des cellules B. Protéine de surface qui s'associe au BCR pour diminuer le seuil de stimulation des LB par l'Ag → prolif lympho +++. Neg chez 50-60% des plasmo tumoraux

**-CD45 ou PTPRC** : degré d'expression variable sur les cellules lymphoïdes ou myéloïdes. En corrélation avec l'étape de différenciation des cellules étudiées. Densité d'expression du CD45 utile pour la discrimination entre cellules leucocytaires normales et malignes (faible dans le cas de leucémies myéloïdes aiguës). Régulateur de signalisation TCR et BCR, impliqué dans croissance cellulaire, différentiation, mitose et transformation oncogénique.

**-CD27 ou TNFRSF7** : a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily. Plays a key role in regulating B-cell activation and immunoglobulin synthesis via liaison au ligand CD70. This receptor transduces signals that lead to the activation of NF-κB and MAPK8/JNK. Maintenance de l'immunité à long terme par les LT. La protéine "SIVA" induit une apoptose en s'y liant.